



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

**0 171 024**  
**A1**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

㉑ Anmeldenummer: 85109567.9

㉓ Int. Cl. 4: C 12 N 15/00, C 12 P 21/02,  
C 12 P 19/34, C 07 K 7/10,  
C 12 N 1/20  
// C12R1:19

㉒ Anmeldetag: 30.07.85

㉔ Priorität: 10.08.84 DE 3429430

㉕ Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,  
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

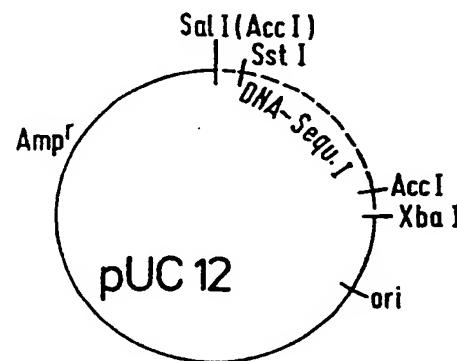
㉖ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 12.02.86  
Patentblatt 86/7

㉗ Erfinder: Brauer, Dieter, Dr., Berliner Strasse 14,  
D-6093 Flörsheim am Main (DE)  
Erfinder: Engels, Joachim, Prof. Dr., Feldbergstrasse 1,  
D-6242 Kronberg/Taunus (DE)  
Erfinder: Habermann, Paul, Dr., Heimchenweg 80,  
D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)  
Erfinder: Uhlmann, Eugen, Dr., Washington Street 287,  
Belmont, Mass. 02178 (US)  
Erfinder: Wengenmayer, Friedrich, Dr., Am  
Seyenbach 38, D-6238 Hofheim am Taunus (DE)

㉘ Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU  
NL SE

㉙ Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Hirudinen und Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.

㉚ Mit Hilfe einer speziellen DNA-Sequenz kann in einem gentechnologischen Verfahren Hirudin gewonnen werden. Das Gen wird vorteilhaft in Form mehrerer Fragmente synthetisiert, die enzymatisch zu zwei grösseren Teilsequenzen ligiert werden, welche in Hybridplasmide eingebaut und in Wirtsorganismen amplifiziert werden. Nach Reisolierung der Teilsequenzen werden diese zum Gesamtgen vereinigt, in ein Hybridplasmid eingebaut und dieses in einem Wirtsorganismus zur Expression gebracht.



**EP 0 171 024 A1**

0 171 024

- 1 -  
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT HOE 84/F 181

Dr.KL/St

Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Hirudinen  
und Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens

Hirudin ist ein aus Hirudo medicinalis gewonnenes Polypeptid, das eine spezifische Antithrombin-Aktivität zeigt und als Antikoagulans dient.

- 5 Es wurde nun gefunden, daß sich Polypeptide der allgemeinen Formel I

(X)<sub>m</sub>-A-B-C-Tyr-D-Asp-Cys-E-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-  
10 -Leu-Gly-Ser-Asp-F-G-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-  
-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-  
15 -H-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-(Z)<sub>n</sub>-OH

(I)

in welcher

20 m= 0 - 50,

n= 0 - 100 und

X für gleiche oder verschiedene Reste genetisch codierbarer Aminosäuren steht,

A Ile oder eine direkte Bindung,

25 B Ile, Thr oder eine direkte Bindung,

C Thr, Val, Ile, Leu oder Phe,

D Thr oder eine direkte Bindung,

E Thr oder Ile,

F Gly oder eine direkte Bindung,

30 G Glu oder eine direkte Bindung,

H Glu oder Pro bedeuten, und

Z für gleiche oder verschiedene Reste genetisch codierbarer Aminosäuren steht und

in der gegebenenfalls jeweils 2 der 6 Cys-Reste über Disulfid-Brücken verknüpft sind, auch gentechnologisch herstellen lassen, wenn man in ein Expressionsplasmid ein Gen einbaut, das für ein Polypeptid der Formel I oder 5 Teilsequenzen davon codiert. Dieses wird im folgenden auch als "Hirudin" bezeichnet.

Das erforderliche Gen kann nach bekannten Methoden chemisch synthetisiert, aus dem Genom isoliert und 10 prozessiert werden oder aus induzierten Zellen nach bekannten Methoden die mRNA isoliert und hieraus die cDNA gewonnen werden.

Bevorzugt ist der Weg über die cDNA und vor allem 15 die chemische Synthese, insbesondere nach der Phosphit-Methode. Bevorzugt ist weiterhin die Synthese eines Gens, welches für das Polypeptid der Formel I codiert, in welcher m 1 und n Null ist, X für Met oder Arg, B für Thr oder eine direkte Bindung, C für Thr und G für Glu 20 stehen. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft Polypeptide der Formel I, in der  $(X)_m$ -A-B-C- nicht für Val-Val steht, wenn n Null ist, D und E Thr, F Gly und G und H Glu bedeuten.

25 Besonders bevorzugt ist die Synthese von Polypeptiden der Formel I, in denen m 1 ist, X Met oder Arg, A und B direkte Bindungen, C, D und E Thr, F Gly, G und H Glu und n Null bedeuten. Die hierfür bevorzugte DNA-Sequenz I ist im Anhang wiedergegeben und dient im folgenden zur Erläuterung der Erfindung. 30

Der genetische Code ist bekanntlich "entartet", d.h. daß nur für zwei Aminosäuren eine einzige Nucleotid-Sequenz codiert, während den restlichen 18 genetisch codierbaren 35 Aminosäuren 2 bis 6 Triplets zuzuordnen sind. Von den hierdurch gegebenen Variationsmöglichkeiten machen außerdem die Wirtszellen unterschiedlicher Spezies nicht

immer den gleichen Gebrauch. Für die Synthese der Gene besteht somit eine unübersehbare Vielfalt von Codon-Möglichkeiten.

- 5 Es wurde nun gefunden, daß die DNA-Sequenz I (Anhang), die für die gesamte Aminosäuresequenz codiert, sowie die zur Synthese der Sequenz I benutzten DNA-Teilsequenzen II A und II B besonders vorteilhaft für die gentechnologische Synthese der besonders bevorzugten Form des
- 10 Hirudin sind. Am 5'-Ende des codierenden Stranges der DNA-Sequenz I befindet sich eine "überhängende" DNA-Sequenz, entsprechend der Restriktionsendonuclease XbaI, am 3'-Ende des codierenden Stranges dagegen die einzelsträngige, überhängende Sequenz entsprechend dem
- 15 Restriktionsenzym Sal I. Diese beiden unterschiedlichen Erkennungssequenzen gewährleisten die Insertion der DNA in Plasmide in der gewünschten Orientierung. (Es ist aber auch möglich, gleiche Erkennungssequenzen zu wählen und nach Charakterisierung der Plasmid-DNA mittels entsprechender Restriktions- oder DNA-Sequenzanalyse oder durch Expression eine entsprechende Selektion vorzunehmen).

Zwischen diesen Erkennungssequenzen und den Codons für die Aminosäurefolge befindet sich am 5'-Ende des codierenden

- 25 Stranges das Codon für die Aminosäure Methionin (das in der DNA-Sequenz I mit 0 beziffert ist). Alternativ hierzu kann eine Praesequenz (auch Signal- oder leader-Sequenz genannt) eines bakteriellen oder sonstigen wirtseigenen Proteins stehen (Übersichtsartikel: Perlman und Halvorson; J. Mol. Biol. 167 (1983), 391), welche die Sekretion des gewünschten Polypeptids aus dem Cytoplasma bewirkt und bei diesem Exkretionsprozeß von einer in der Wirtszelle natürlich vorkommenden Signal-Peptidase abgespalten wird. Am Ende des codierenden Stranges folgen dann erfindungsgemäß
- 30 auf das für Glutamin codierende Triplet ein Stop-Codon oder bevorzugt - wie in der DNA-Sequenz I dargestellt -
- 35

zwei Stop-Triplets. Zwischen diesen Stop-Triplets und dem überhängenden SalI-Ende ist zusätzlich in der DNA-Sequenz I eine Nucleotidsequenz entsprechend dem Restriktionsenzym SstI eingebaut.

5

Eine interne singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bam HI (im Codon 30/31) ermöglicht die Subklonierung zweier Genfragmente HIR-I und HIR-II (siehe DNA-Sequenz II), die in gut untersuchte Klonierungsvektoren, wie etwa 10 pBR 322, pUC 8 oder pUC 12, eingebaut werden können. Zusätzlich wurden innerhalb des Gens eine Reihe von weiteren singulären Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingebaut, die einerseits einen Zugang zu Teilsequenzen des Hirudin schaffen und andererseits die Durchführung von 15 Variationen erlauben (Tabelle 1):

Tabelle 1:

	Restriktions- enzym	Schnitt nach Nucleotid-Nr. (codierender Strang)
20	Rsa I <sup>a)</sup>	8
	Acc I	12
	Hinf I	27
	Xho II <sup>a)</sup>	57
25	Fnu 4 HI	71
	Hae III	73
	Bst NI	75
	Hph I	117
	Rsa I <sup>b)</sup>	137
30	Kpn I	139
	Taq I	172
	Xho II <sup>b)</sup>	178
	Dde I	184
	Mbo II	186
35	Sst I	210

a) singulär bezüglich der Teilsequenz HIR-I

b) " " " " " HIR-II

Die DNA-Sequenz I lässt sich aus 14 Oligonucleotiden mit einer Länge von 25 bis 35 Nucleotiden aufbauen (siehe DNA-Sequenz II), indem diese zunächst chemisch synthetisiert und dann über "sticky ends" von 4 bis 6 Nucleotiden enzymatisch verknüpft werden.

Bei der DNA-Sequenz I wurde weiterhin berücksichtigt, daß bei denjenigen Aminosäuren, denen mehrere Codons zuzuordnen sind, diese nicht gleichwertig sind, sondern vielmehr 10 in der jeweiligen Wirtszelle wie E. coli unterschiedliche Präferenzen zeigen. Weiterhin wurden palindromische Sequenzen auf ein Mindestmaß reduziert.

Die Genstruktur der DNA-Sequenz I ist somit leicht aus 15 relativ kleinen Bausteinen zugänglich, ermöglicht die Subklonierung zweier Genfragmente in gut bekannte Vektoren und erlaubt deren Kombination zum Gesamtgen sowie gegebenenfalls Veränderungen derselben.

20 Je nach Einbau des synthetischen Gens in den Klonierungsvektor wird das erwünschte Peptid mit der Aminosäuresequenz des Hirudins unmittelbar (DNA-Sequenz IC) oder in Form eines Fusionsproteins mit einem bakteriellen Protein wie  $\beta$ -Galactosidase oder Partialsequenzen desselben exprimiert. Solche Fusionsproteine können dann in bekannter Weise chemisch oder enzymatisch gespalten werden. Steht 25 beispielsweise in der Position 0 der Sequenz I die Aminosäure Methionin (DNA-Sequenz IA), so kann eine chemische Spaltung mit Bromcyan erfolgen, steht in dieser 30 Position die Aminosäure Arginin (DNA-Sequenz IB), so kann eine enzymatische Spaltung mit Trypsin erfolgen.

Bevorzugte Variationen der Aminosäuresequenzen sind in der Tabelle 2 dargestellt, wobei m und n Null sind:

Tabelle 2:

	A	B	C	D	E	F	G	H
a)	Ile	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Glu	Glu
b)	Ile	-	Thr	Thr	Thr	Gly	Glu	Glu
5	c)	Ile	-	Thr	Thr	Ile	Gly	Glu
d)	Ile	-	Thr	Thr	Thr	Gly	Glu	Pro
e)	Ile	-	Thr	Thr	Ile	Gly	Glu	Pro
f)	-	-	Thr	-	Thr	Gly	-	Glu
g)	-	-	Thr	Thr	Thr	Gly	-	Glu

10

Diese Modifikationen lassen sich nach Zusammensetzung des synthetischen Gens auf DNA-Ebene leicht durch Austausch der entsprechenden Genfragmente gegen de-novo-synthetisierte DNA-Sequenzen unter Ausnutzung entsprechender Restriktionsenzym-Schnittstellen realisieren.

Als Beispiel für eine Variation der Aminosäuresequenz sei das (bekannte) Polypeptid der Formel I genannt, in der m 1 ist, X und C für Val stehen, A und B direkte Bindungen darstellen, D und E Thr, F Gly, G und H Glu und n Null bedeuten. Diese Modifikation lässt sich auf der DNA-Ebene leicht über die Schnittstelle entsprechend dem Restriktionsenzym Acc I realisieren.

25 Der Einbau der synthetischen Gene bzw. Genfragmente in Klonierungsvektoren, beispielsweise in die handelsüblichen Plasmide pUC 8, pUC 12 und pBR 322 bzw. andere allgemein zugängliche Plasmide wie ptac 11 und pKK 177.3, erfolgt in an sich bekannter Weise. Auch können die chemisch synthetisierten Gene zuvor mit geeigneten chemisch synthetisierten Kontrollregionen versehen werden, die eine Expression der Proteine ermöglichen. Hierzu kann auf das Lehrbuch von Maniatis (Molecular Cloning, Maniatis et al., Cold Spring Harbor, 1982) verwiesen werden. Die Transformation der so erhaltenen Hybridplasmide in geeignete Wirtsorganismen, vorteilhaft *E. coli*, ist ebenfalls an sich

bekannt und in dem vorstehend genannten Lehrbuch eingehend beschrieben. Die Gewinnung des exprimierten Proteins und dessen Reinigung können nach an sich bekannten Verfahren erfolgen.

5

Die erfindungsgemäß erhaltenen Genfragmente HIR-I und HIR-II, die damit erhaltenen Hybridplasmide und die transformierten Wirtsorganismen sind neu und Gegenstand der Erfindung. Dasselbe gilt für aus der DNA-Sequenz I abgewandelte neue DNA-Sequenzen. Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Patentansprüchen niedergelegt.

In den folgenden Beispielen werden noch einige Ausgestaltungen der Erfindung im einzelnen erläutert, woraus sich die Vielzahl der möglichen Abwandlungen und Kombinationen für den Fachmann ergeben. Prozentangaben beziehen sich hierbei auf das Gewicht, wenn nichts anderes angegeben ist.

20 Beispiele

1. Chemische Synthese eines einzelsträngigen Oligonucleotids

Am Beispiel des Genbausteins Ia, der die Nucleotide 1-32 des codierenden Strangs umfaßt, wird die Synthese der Genbausteine erläutert. Nach bekannten Methoden (M.J. Gait et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980) 1081-1096)) wird das am 3'-Ende stehende Nucleosid, im vorliegenden Falle also Thymidin (Nucleotid Nr. 32), an Kieselgel (R) FRACTOSIL, Firma Merck) über die 3'-Hydroxyfunktion covalent gebunden. Hierzu wird zunächst das Kieselgel unter Abspaltung von Ethanol mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin umgesetzt, wobei eine Si-O-Si-Bindung entsteht. Das Thymidin wird als 3'-O-Succinoyl-5'-dimethoxytritylether in Gegenwart von Paranitrophenol und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid mit dem

modifizierten Träger umgesetzt, wobei die freie Carboxygruppe der Succinoylgruppe den Aminorest der Propylamino-  
gruppe acyliert.

5 In den folgenden Syntheseschritten wird die Basenkomponente als 5'-O-Dimethoxytrityl-nucleosid-3'-phosphorig-  
säuremonomethylester-dialkylamid oder -chlorid eingesetzt, wobei das Adenin als N<sup>6</sup>-Benzoyl-Verbindung, das  
10 Cytosin als N<sup>4</sup>-Benzoyl-Verbindung, das Guanin als N<sup>2</sup>-Isobutyryl-Verbindung und das keine Aminogruppe ent-  
haltende Thymin ohne Schutzgruppe vorliegen.

15 50 mg des polymeren Trägers, der 2 µmol Thymidin gebunden enthält, werden nacheinander mit den folgenden Agentien behandelt:

- a) Nitromethan,
- b) gesättigte Zinkbromidlösung in Nitromethan mit 1 % Wasser,
- 20 c) Methanol,
- d) Tetrahydrofuran,
- e) Acetonitril,
- f) 40 µmol des entsprechenden Nucleosidphosphits und 200 µmol Tetrazol in 0,5 ml wasserfreiem Acetonitril (5 Minuten),
- 25 g) 20 % Acetanhydrid in Tetrahydrofuran mit 40 % Lutidin und 10 % Dimethylaminopyridin (2 Minuten),
- h) Tetrahydrofuran,
- i) Tetrahydrofuran mit 20 % Wasser und 40 % Lutidin,
- 30 j) 3 % Jod in Kollidin/Wasser/Tetrahydrofuran im Volumenverhältnis 5:4:1,
- k) Tetrahydrofuran und
- l) Methanol.

35 Unter "Phosphit" wird hierbei der Desoxyribose-3'-mono-phosphorigsäure-monomethylester verstanden, wobei die

dritte Valenz durch Chlor oder eine tertiäre Amino-  
gruppe, beispielsweise einen Morpholinorest, abgesättigt  
ist. Die Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte können  
jeweils nach der Detritylierungsreaktion b) spektropho-  
5 tometrisch durch Messung der Absorption des Dimethoxy-  
tritylkations bei einer Wellenlänge von 496 nm bestimmt  
werden.

10 Nach abgeschlossener Synthese des Oligonucleotids werden  
die Methylphosphatschutzgruppen des Oligomers mit Hilfe  
von p-Thiokresol und Triethylamin abgespalten.

15 Anschließend wird durch 3-stündige Behandlung mit  
Ammoniak das Oligonucleotid vom festen Träger abge-  
trennt. Eine 2- bis 3-tägige Behandlung der Oligomeren  
mit konzentriertem Ammoniak spaltet die Aminoschutz-  
gruppen der Basen quantitativ ab. Das so erhaltene Roh-  
produkt wird durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie  
(HPLC) oder durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gerei-  
20 nigt.

Ganz entsprechend werden auch die übrigen Genbausteine  
Ib-IIh synthetisiert, deren Nucleotidfolge aus der DNA-  
Sequenz II hervorgeht.  
25

2. Enzymatische Verknüpfung der einzelsträngigen Oligo-  
nucleotide zu den Genfragmenten HIR-I und HIR-II

30 Zur Phosphorylierung der Oligonucleotide am 5'-Terminus  
wurde je 1 nmol der Oligonucleotide Ib bis Ie mit 5 nmol  
Adenosintriphosphat mit vier Einheiten T4-Polynukleotid-  
Kinase in 20 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 10 mM  
Magnesiumchlorid und 10 mM Dithiothreitol (DTT) 30 Minu-  
ten bei 37°C behandelt. Das Enzym wird durch fünf-  
35 minütiges Erhitzen auf 95°C desaktiviert. Die Oligo-  
nucleotide Ia, If, IIa und IIh, welche in der DNA-  
Sequenz IIA und IIB die "überhängende" Sequenz bil-

den, werden nicht phosphoryliert. Dies verhindert bei der nachfolgenden Ligation die Ausbildung größerer Subfragmente als sie der DNA-Sequenz IIA oder IIB entsprechen.

5

Die Oligonucleotide Ia-If werden wie folgt zum Subfragment HIR-I ligiert: Je 1 mmol der Oligonucleotide Ia und If sowie der 5'-Phosphate von Ib, Ic, Id und Ie werden zusammen in 45 µl Puffer, enthaltend 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 20 mM Magnesiumchlorid, 25 mM Kaliumchlorid und 10 mM DTT, gelöst. Für das "Annealing" der Oligonucleotide gemäß DNA-Sequenz IIA wird die Lösung der Oligonucleotide 2 Minuten auf 95°C erhitzt und dann langsam (2-3 Stunden) auf 20°C abgekühlt. Zur enzymatischen Verknüpfung setzt man dann 2 µl 0,1 M DTT, 8 µl 2,5 mM Adenosintriphosphat (pH 7) sowie 5 µl T4-DNA-Ligase (2 000 Units) zu und inkubiert 16 Stunden bei 22°C.

20

Analog werden die Oligonucleotide IIb bis IIg phosphoryliert und dann mit den Oligonucleotiden IIA und IIh zusammen zum Subfragment HIR-II ligiert.

25

Die Reinigung der Genfragmente HIR-I und HIR-II erfolgt durch Gelelektrophorese auf einem 10%igen Polyacrylamidgel (ohne Harnstoffzusatz, 20 • 40 cm, 1 mm Dicke), wo bei als Markersubstanz φX 174 DNA (Fa. BRL), geschnitten mit Hinf I, oder pBR 322, geschnitten mit Hae III, dient.

30

3. Herstellung von Hybridplasmiden, die die Genfragmente HIR-I und HIR-II enthalten

a) Einbau des Genfragments HIR-I in pUC 12

35

Das handelsübliche Plasmid pUC 12 wird in bekannter Weise mit den Restriktionsendonukleasen Xba I und

0 171 024

Bam HI nach den Angaben der Hersteller geöffnet.  
Der Verdauungsansatz wird auf einem 5%igen Poly-  
acrylamidgel durch Elektrophorese in bekannter  
Weise aufgetrennt und die Bruchstücke durch Anfär-  
ben mit Ethidiumbromid oder durch radioaktive  
Markierung ("Nick-Translation" nach Maniatis,  
a.a.o.) sichtbar gemacht. Die Plasmidbande wird  
anschließend aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten  
und elektrophoretisch vom Polyacrylamid abge-  
trennt. Die Auftrennung des Verdauungsansatzes kann  
auch auf 2%igen niedrigschmelzenden Agarosegelen  
(wie in Beispiel 5a) beschrieben) erfolgen.

15 1 µg Plasmid wird dann mit 10 ng Genfragment HIR-I,  
das zuvor wie in Beispiel 2 beschrieben phosphory-  
liert wurde, über Nacht bei 16°C ligiert. Man er-  
hält das Hybridplasmid gemäß Figur 1.

20 b) Einbau des Genfragments HIR-II in pUC 8  
Analog zu a) wird das handelsübliche Plasmid pUC 8  
mit Bam HI und Sal I aufgeschnitten und mit dem  
Genfragment HIR-II, das zuvor wie in Beispiel 2  
beschrieben phosphoryliert wurde, ligiert. Man er-  
hält das Hybridplasmid gemäß Figur 2.

25 4. Synthese des kompletten Gens und Einbau in ein Plasmid

30 a) Transformation und Amplifikation  
Die so erhaltenen Hybridplasmide werden in E. coli  
transformiert. Hierzu wird der Stamm E. coli K 12  
durch Behandlung mit einer 70 mM Calciumchloridlösung  
kompetent gemacht und mit der Suspension des Hybrid-  
plasmids in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5), der 70 mM  
an Calciumchlorid ist, versetzt. Die transformierten  
35 Stämme werden wie üblich unter Ausnutzung der durch  
das Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenzen bzw.

-empfindlichkeiten selektioniert und die Hybridvektoren amplifiziert. Nach Abtöten der Zellen werden die Hybridplasmide isoliert, mit den ursprünglich eingesetzten Restriktionsenzymen aufgeschnitten und die Genfragmente HIR-I und HIR-II durch Gel-elektrophorese isoliert.

### b) Verknüpfung der Genfragmente

10 Die durch Amplifikation erhaltenen Subfragmente HIR-I und HIR-II werden wie im Beispiel 2 beschrieben (Annealing bei 60°C) enzymatisch verknüpft und das so erhaltene synthetische Gen mit der DNA-Sequenz I in den Klonierungsvektor pUC 12 eingeführt. Man erhält ein Hybridplasmid gemäß Figur 3.

15

### c) Herstellung eines Gens für Val<sup>1</sup>, Val<sup>2</sup>-Hirudin

Aus dem Plasmid gemäß Figur 3 wird wie in Beispiel 5a) beschrieben das AccI-SalI-Fragment (Nucleotide 13-212) erhalten, welches dann mit Hilfe des folgenden Adaptors

5' CT AGA ATG GTT GTA T 3'  
 3' T TAC CAA CAT ATA 5'  
 25 XbaI AccI

in das Plasmid pUC 12, das zuvor mit XbaI und SalI geöffnet wurde, ligiert werden kann.

30

d) Herstellung eines Gens für die Variante a) der Tabelle 2

Hierzu wird die folgende DNA-Sequenz synthetisiert:

Glu Phe Met Ile Thr Thr

5' GG GAA TTC ATG ATC ACA ACG T 3'  
 CC CTT AAG TAC TAG TGT TGC ATA  
 Smal AccI

Diese Sequenz kann als SmaI-AccI-Adaptor in die mit den Restriktionsenzymen SmaI und AccI geöffnete DNA aus dem Plasmid gemäß Figur 3 eingebaut werden.

- 5 e) Herstellung eines Gens für die Variante b) der  
Tabelle 2  
Zunächst wird die folgende DNA-Sequenz synthetisiert:

		Glu	Phe	Met	Ile	Thr			
10	5'	GG	GAA	TTC	ATG	ATC	ACG	T	3'
		CC	CTT	AAG	TAC	TAG	TGC	ATA	
		SmaI						AccI	

Diese um das ACA-Triplett verkürzte DNA-Sequenz wird wie unter d) beschrieben eingebaut.

- 20 f) Herstellung eines Gens für die Variante c) der Tabelle 2  
Man geht von der DNA-Sequenz aus, wie sie vorstehend unter e) beschrieben ist (Variante b) der Tabelle 2).  
Nach Spaltung mit AccI und SalI erhält man zwei Fragmente, die isoliert werden. Das AccI-SalI-(Hirudin)-Fragment wird mit dem Enzym HinfI geschnitten und das größere der erhaltenen Fragmente isoliert. Dieses Fragment, die mit AccI-SalI-geöffnete Restplasmid-DNA und die synthetische DNA-Sequenz

25

		Thr	Asp	Cys	Ile		
5'	AT	ACT	GAC	TGC	ATC	G	3'
30		TGA	CTG	ACG	TAG	CTT	A
		<b>AccI</b>					<b>HinfI</b>

werden im gleichen Gefäß ligiert. Das erhaltene Hybridplasmid kodiert für die Variante c) der Tabelle 2.

g) Herstellung eines Gens für die Variante d) der  
Tabelle 2

5 Man geht ebenfalls von der DNA-Sequenz aus, wie sie  
vorstehend unter e) beschrieben ist (also für die  
Variante b) der Tabelle 2 kodiert), die mit AccI  
und SalI geschnitten wird. Das AccI-SalI-(Hirudin)-  
Fragment wird aber mit TaqI und DdeI umgesetzt und  
das herausgespaltene Fragment durch die synthetische  
DNA-Sequenz

10

	Glu	Pro	Ile				
5'	C	GAA	CCG	ATC	CC		3'
	TT	GGC	TAG	GGA	CT		
	TaqI				Dde I		

15

ersetzt. Das derart veränderte AccI-SalI-(Hirudin)-  
Fragment wird nun mit der Restplasmid-DNA ligiert.  
Das erhaltene Plasmid kodiert für die Variante d)  
der Tabelle 2.

20

h) Herstellung eines Gens für die Variante g) der  
Tabelle 2

25 Aus dem Hybridplasmid gemäß Figur 2 wird das BamHI-  
SalI-(Hirudin)-Fragment isoliert und mit KpnI nach-  
geschnitten. Das größere der beiden entstandenen  
Fragmente wird isoliert und mit der synthetischen  
DNA-Sequenz

30

	Ser	Asp	Gly	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	
5'	GA	TCC	GAC	GAA	AAG	AAC	CAG	TGC	GTT
	G	CTG	CTT	TTC	TTG	GTC	ACG	CAA	
	BamHI								

35

	Thr	Gly	Glu	Gly				
5'	ACT	GGC	GAA	GGT	AC		3'	
	TGA	CCG	CTT	C		Kpn I		

ligiert. Das Ligationsprodukt wird nun mit dem XbaI-

BamHI-(Hirudin)-Fragment, isoliert aus Plasmid-DNA gemäß Figur 1, verknüpft und - wie unter 4b) beschrieben - in pUC 12 eingeführt. Man erhält ein Hybridplasmid, das für die Variante g) der Tabelle 2 kodiert.

5

- i) Herstellung eines Gens für die Variante f) der Tabelle 2

Aus der DNA, die für die Variante g) der Tabelle 2 kodiert, wird das XbaI-SalII-(Hirudin)-Fragment isoliert und mit HinfI umgesetzt. Das größere der beiden entstandenen Fragmente wird dann mit der synthetischen DNA-Sequenz

15

Arg	Met	Thr	Tyr	Asp	Cys	Thr			
5' CT	AGA	ATG	ACG	TAT	GAC	TGC	ACT	G	3'
	T	TAC	TGC	ATA	CTG	ACG	TGA	CTT	A

XbaI

Hinf I

20

ligiert und das Ligationsprodukt in das mit XbaI und SalII geöffnete Plasmid pUC 12 inseriert. Das Hybridplasmid kodiert für die Variante f) der Tabelle 2.

- j) Herstellung weiterer Varianten

25

Als Beispiele für weitere mögliche Varianten seien die folgenden angeführt:

30

Die DNA-Sequenzen, die für die Varianten c) und d) der Tabelle 2 kodieren, enthalten die BamHI-Erkennungsstelle entsprechend Position 97 bp der DNA-Sequenz I. Unter Ausnutzung dieser Schnittstelle lassen sich nun die vorstehend beschriebenen AccI-BamHI- bzw. BamHI-SalII-Teilsequenzen der beiden Varianten beliebig miteinander verknüpfen.

35

Alle diese Varianten können, analog wie für die DNA-Sequenz I beschrieben, in E. coli transformiert und exprimiert werden.

5. Konstruktion von Hybridplasmiden für die Expression  
der DNA-Sequenzen IA, IB und IC

- a) Einbau der DNA-Sequenz IC in pKK 177.3 (Direktx-  
pression)

5 Das Expressionsplasmid pKK 177.3 (Plasmid ptac 11,  
Amman et al., Gene 25 (1983) 167, bei dem in die Eco  
RI-Erkennungsstelle synthetisch eine Sequenz einge-  
baut wurde, die eine Sal I-Schnittstelle enthält)  
10 wird mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I  
geöffnet. Aus dem Plasmid gemäß Figur 3 wird die DNA-  
Sequenz IC folgendermaßen gewonnen. Man schneidet das  
Plasmid zuerst mit dem Restriktionsenzym Sal I, dann  
mit dem Enzym Acc I und trennt dann das kleine Acc I -  
15 Sal I-Fragment durch Gelelektrophorese auf einem  
2%igen niedrig schmelzenden Agarosegel von der Plas-  
midbande ab, indem man die DNA durch Auflösen des Gels  
bei erhöhter Temperatur (nach Maßgabe der Hersteller)  
wiedergewinnt. Dieses DNA-Fragment lässt sich mit  
20 Hilfe des folgenden Adaptors

5' AATTC ATG ACG T 3'  
3' G TAC TGC ATA 5'  
Eco RI                            Acc I  
zur DNA-Sequenz IC umsetzen.

25 Durch Ligation des aufgeschnittenen Plasmids pKK 177.3  
mit dem Gen IC wird ein Hybridplasmid geschaffen, bei  
dem der Insertion eine Expressions- bzw. Regulations-  
region vorgeschaltet ist. Nach Zugabe eines geeigneten  
Induktors wie Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG)  
30 wird eine mRNA gebildet, die zur Expression des  
Methionyl-Polypeptids entsprechend der DNA-Sequenz  
IC führt.

- b) Einbau der Hirudin-Gene IA bzw. IB in das Ex-  
pressionsplasmid pCK-5196 (Fusionskonstruktion)

Das Expressionsplasmid pCK-5196 (Fig. 4) ist ein Derivat des Plasmids pAT 153 (Twigg u. Sherratt), welches selbst ein "high-copy-number"-Derivat des bekannten Plasmids pBR 322 darstellt. Es enthält den bekannten Lac UV<sup>5</sup>-Promotor mit der bekannten Sequenz der  $\beta$ -Galaktosidase bis Nukleotid Nr. 1554 (entsprechend Aminosäure Nr. 518:Trp), eingesetzt zwischen das tet<sup>R</sup>-Gen (Hind III von pBR 322) und den Terminator des amp<sup>R</sup>-Gens (Aha III in Pos. 3231 in pBR 322). Ein weiteres Merkmal dieses Vektors ist die zwischen die  $\beta$ -Galaktosidassequenz und die Terminatorsequenz eingesetzte, aus dem bekannten Plasmid pUC 13 stammende Polylinker-Sequenz. Die Transkription des lac UV<sup>5</sup>-Promoters läuft gegen das tet<sup>R</sup>-Gen ab.

Dieses Plasmid enthält bei der Aminosäure Nr. 518 der  $\beta$ -Galactosidase den Polylinkeranteil Xba I-Bam HI-Sma I-Sst I aus dem Plasmid pUC 13, der als Klonierungsstelle für eukaryotische Gene dient. Das Plasmid pCK-5196 wird mit Hilfe der Restriktionsenzyme Xba I und Sst I geöffnet und mit der DNA-Sequenz IA ligiert, welche man aus dem Plasmid gemäß Fig. 3 durch Xba I-Sst I-Verdauung isolieren kann. Man erhält ein Hybridplasmid gemäß Fig. 5, das hinter der lac UV<sup>5</sup>-Kontrollregion die Codons für die ersten 518 Aminosäuren der  $\beta$ -Galactosidase und daran anschließend die Codons für Ser-Arg-Met-(Hirudin 1-64) enthält.

Auf gleiche Weise kann man ein Hybridplasmid gem. Fig. 6 erhalten, welches im Plasmid pCK-5196 die Insertion mit der DNA-Sequenz IB enthält, bei welcher dem Codon für die Aminosäure Nr. 1 (Threonin) nun aber das Codon für die Aminosäure Arginin vorangestellt ist. Die DNA-Sequenz IB erhält man aus dem Plasmid gemäß Fig. 3, indem man dieses mit den Restriktionsenzymen Sst I und Acc I schneidet und mit dem folgenden Adaptor lisiert:

5' CT AGA CGT ACG T 3'  
3' T GCA TGC ATA 5'  
Xba I Acc I

5 6. Transformation der Hybridplasmide.

Kompetente E. coli-Zellen werden mit 0,1 bis 1 µg der  
Hybridplasmide, die die Sequenz I bzw. IA, IB oder IC  
enthalten, transformiert und im Falle der tac-Plasmide  
10 auf Ampicillin enthaltenden Agarplatten, im Falle der  
pCK-5196 Hybridplasmide auf Tetracyclin enthaltenden  
Agarplatten plattiert. Anschließend lassen sich Klone,  
die die korrekt integrierten Hirudin-Sequenzen in den  
entsprechenden Plasmiden enthalten, durch DNA-Schnellauf-  
arbeitung identifizieren (Maniatis, a.a.O.).

7. Expression der Hirudin-Aktivität aufweisenden  
Polypeptide

20 Nach Transformation der genannten tac-Hybridplasmide in  
E. coli wird ein Polypeptid exprimiert, das außer der  
Hirudin-Aminosäuresequenz am Aminoterminus noch eine  
zusätzliche Methionylgruppe trägt, welche aber durch  
Bromcyan spaltung eliminierbar ist. Dagegen erhält man  
25 nach der Transformation von E. coli mit dem Hybridplasmid  
gemäß Fig. 5 bzw. Fig. 6 Fusionsproteine aus 518 Amino-  
säuren der β-Galactosidase und Hirudin, die über die  
Sequenz Ser-Arg-Met bzw. Ser-Arg-Arg miteinander ver-  
brückt sind. Diese Fusionsproteine lassen sich mit Brom-  
30 cyan bzw. mit Trypsin zu Hirudin und β-Galactosidase-  
Fragmenten spalten.

8. Aufarbeitung und Reinigung

35 Die zur gewünschten optischen Dichte kultivierten  
Bakterienstämme werden mit einem geeigneten Induktor,

beispielsweise IPTG, hinreichend lange, beispielsweise 2 Stunden, inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 0,1 % Kresol und 0,1 mM Benzylsulfonylfluorid abgetötet.

- 5        Nach Zentrifugieren oder Filtrieren wird die Zellmasse in einer Pufferlösung (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und mechanisch aufgeschlossen, beispielsweise mit einer French-Presse bzw. (R) DYNOMühle (Fa. Willy Bachofer, Basel), worauf die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert werden. Aus dem Überstand wird das das Hirudin enthaltende Protein nach üblichen Verfahren gereinigt. Geeignet sind Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Gelfiltrationsäulen oder Affinitätschromatographie an Thrombin- oder Antikörpersäulen. Durch Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgel-oder HPLC-Analytik werden Anreicherung und Reinheit des Produktes kontrolliert. Fusionsproteine mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Anteil lassen sich bereits im Rohextract der lysierten Bakterien anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens von der  $\beta$ -Galactosidase (I-518) nachwiesen. Die Charakterisierung des gentechnologisch erzeugten Hirudins erfolgt durch Vergleich mit der aus Blutegeln isolierten, authentischen Substanz bzw. mit Hilfe von Tests, die auf den blutgerinnungshemmenden Eigenschaften des Hirudins beruhen.
- 10      das Hirudin enthaltende Protein nach üblichen Verfahren gereinigt. Geeignet sind Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Gelfiltrationsäulen oder Affinitätschromatographie an Thrombin- oder Antikörpersäulen. Durch Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgel-oder HPLC-Analytik werden Anreicherung und Reinheit des Produktes kontrolliert. Fusionsproteine mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Anteil lassen sich bereits im Rohextract der lysierten Bakterien anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens von der  $\beta$ -Galactosidase (I-518) nachwiesen. Die Charakterisierung des gentechnologisch erzeugten Hirudins erfolgt durch Vergleich mit der aus Blutegeln isolierten, authentischen Substanz bzw. mit Hilfe von Tests, die auf den blutgerinnungshemmenden Eigenschaften des Hirudins beruhen.
- 15      das Hirudin enthaltende Protein nach üblichen Verfahren gereinigt. Geeignet sind Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Gelfiltrationsäulen oder Affinitätschromatographie an Thrombin- oder Antikörpersäulen. Durch Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgel-oder HPLC-Analytik werden Anreicherung und Reinheit des Produktes kontrolliert. Fusionsproteine mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Anteil lassen sich bereits im Rohextract der lysierten Bakterien anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens von der  $\beta$ -Galactosidase (I-518) nachwiesen. Die Charakterisierung des gentechnologisch erzeugten Hirudins erfolgt durch Vergleich mit der aus Blutegeln isolierten, authentischen Substanz bzw. mit Hilfe von Tests, die auf den blutgerinnungshemmenden Eigenschaften des Hirudins beruhen.
- 20      das Hirudin enthaltende Protein nach üblichen Verfahren gereinigt. Geeignet sind Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Gelfiltrationsäulen oder Affinitätschromatographie an Thrombin- oder Antikörpersäulen. Durch Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgel-oder HPLC-Analytik werden Anreicherung und Reinheit des Produktes kontrolliert. Fusionsproteine mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Anteil lassen sich bereits im Rohextract der lysierten Bakterien anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens von der  $\beta$ -Galactosidase (I-518) nachwiesen. Die Charakterisierung des gentechnologisch erzeugten Hirudins erfolgt durch Vergleich mit der aus Blutegeln isolierten, authentischen Substanz bzw. mit Hilfe von Tests, die auf den blutgerinnungshemmenden Eigenschaften des Hirudins beruhen.
- 25      das Hirudin enthaltende Protein nach üblichen Verfahren gereinigt. Geeignet sind Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Gelfiltrationsäulen oder Affinitätschromatographie an Thrombin- oder Antikörpersäulen. Durch Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgel-oder HPLC-Analytik werden Anreicherung und Reinheit des Produktes kontrolliert. Fusionsproteine mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Anteil lassen sich bereits im Rohextract der lysierten Bakterien anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens von der  $\beta$ -Galactosidase (I-518) nachwiesen. Die Charakterisierung des gentechnologisch erzeugten Hirudins erfolgt durch Vergleich mit der aus Blutegeln isolierten, authentischen Substanz bzw. mit Hilfe von Tests, die auf den blutgerinnungshemmenden Eigenschaften des Hirudins beruhen.



DNA-Sequenz IA:

O  
Met (Aminosäuren 1-64)  
1 5 205 210  
5' CT AGA ATG (Nucleotide 9-200) TAA TAG AGC T 3'  
3' T TAC (complement. Nucl.) ATT TAC 5'  
XbaI SstI

DNA-Sequenz IB:

O  
Arg (Aminosäuren 1-64)  
1 5 205 210  
5' CT AGA CGT (Nucleotide 9-200) TAA TAG AGC T 3'  
3' T TAC (complement. Nucl.) ATT ATC 5'  
XbaI SstI

DNA-Sequenz IC:

O  
Met (Aminosäuren 1-64)  
205 210  
5' AA TTC ATG (Nucleotide 9-200) TAA TAG AGC TCG 3'  
G TAC (complement. Nucl.) ATT ATC TCG AGC AGC T 5'  
EcoRI SalI

## DNA-Sequenz II A (HIR-I)

Nucleotid-Nr.		I a								20	
Cod. Strang	5'	CT	AGA	ATG	ACG	TAT	ACT	GAC	TGC		
nicht cod. Strang	3'		T	TAC	TGC	ATA	TGA	CTG	ACG		
XbaI											
I b		I c								50	
		30		40		50					
ACT	GAA	TCT	GGT	CAG	AAC	CTG	TGC	CTG	TGC		
TGA	CTT	AGA	CCA	GTC	TTG	GAC	ACG	GAC	ACG		
I b		I d									
I c		I e								80	
		60		70		80					
GAA	GGA	TCT	AAC	GTT	TGC	GGC	CAG	GGT	AAC		
CTT	CCT	AGA	TTG	CAA	ACG	CCG	GTC	CCA	TTG		
I d		I f									
I e		I f									
		90									
AAA	TGC	ATC	CTT	G	Bam HI	3'					
TTT	ACG	TAG	GAA	CCT	AG	5'					
I f											

## DNA-Sequenz II B (HIR-II)

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit Hirudinaktivität der allgemeinen Formel I

(X)<sub>m</sub>-A-B-C-Tyr-D-Asp-Cys-E-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
5 -Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-  
-Leu-Gly-Ser-Asp-F-G-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-  
-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-  
10 -H-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-(Z)<sub>n</sub>-OH

(I)

15

in welcher

m= 0 - 50,

n= 0 - 100 und

20 X für gleiche oder verschiedene Reste genetisch codierbarer Aminosäuren steht,

A Ile oder eine direkte Bindung,

B Ile, Thr oder eine direkte Bindung,

C Thr, Val, Ile, Leu oder Phe,

D Thr oder eine direkte Bindung,

25 E Thr oder Ile,

F Gly oder eine direkte Bindung,

G Glu oder eine direkte Bindung,

H Glu oder Pro bedeuten, und

30 Z für gleiche oder verschiedene Reste genetisch codierbarer Aminosäuren steht,

dadurch gekennzeichnet, daß man in ein Expressionsplasmid ein Gen einbaut, das für ein Polypeptid der Formel I codiert, wobei weitere der Aminosäuren entfallen oder durch (eine) andere genetisch codierbare Aminosäure(n) ersetzt werden kann (können).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Gen einbaut, dessen nicht-codierender Strang mit dem codierenden Strang des für das Polypeptid der Formel I codierenden Gens hybridisiert.

5

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen chemisch, vorzugsweise nach dem Phos- phitverfahren, oder über die mRNA enzymatisch synthetisiert wird.

10

4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen im Anschluß an das Codon für die carboxyterminale Aminosäure zwei Stop-Codons enthält.

15

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I ( $X$ )<sub>m</sub>-A-B-C- nicht für Val-Val- steht, wenn n Null ist, D und E Thr, F Gly und G und H Glu bedeuten.

20

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen der DNA- Sequenz I entspricht.

25

7. DNA-Sequenzen I, IA, IB, IC, IIA und IIB.

8. Fusionspeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es das Poly- peptid der allgemeinen Formel I ganz oder teilweise ent- hält und vorzugsweise sein bakterieller Anteil die

30

Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Galactosidase ganz oder teil- weise enthält.

35

9. Hybridplasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine DNA- Sequenz enthält, die ganz oder teilweise für das Poly- peptid der Formel I codiert.

10. Wirtsorganismus, vorzugsweise E.coli, der ein Hybrid- plasmid nach Anspruch 9 enthält.

Patentansprüche Österreich:

1. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit Hirudinaktivität der allgemeinen Formel I.

5           H-(X)<sub>m</sub>-A-B-C-Tyr-D-Asp-Cys-E-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-  
-Leu-Gly-Ser-Asp-F-G-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-  
-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-  
10          -H-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-(Z)<sub>n</sub>-OH

(I)

15

in welcher

m= 0 - 50,

n= 0 - 100 und

20          X für gleiche oder verschiedene Reste genetisch codierbarer Aminosäuren steht,  
A Ile oder eine direkte Bindung,  
B Ile, Thr oder eine direkte Bindung,  
C Thr, Val, Ile, Leu oder Phe,  
D Thr oder eine direkte Bindung,  
25          E Thr oder Ile,  
F Gly oder eine direkte Bindung,  
G Glu oder eine direkte Bindung,  
H Glu oder Pro bedeuten, und  
Z für gleiche oder verschiedene Reste genetisch codierbarer Aminosäuren steht,  
30          dadurch gekennzeichnet, daß man in ein Expressionsplasmid ein Gen einbaut, das für ein Polypeptid der Formel I codiert, wobei weitere der Aminosäuren entfallen oder durch (eine) andere genetisch codierbare Aminosäure(n) ersetzt  
35          werden kann (können).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Gen einbaut, dessen nicht-codierender Strang mit dem codierenden Strang des für das Polypeptid der Formel I codierenden Gens hybridisiert.

5

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen chemisch, vorzugsweise nach dem Phosphitverfahren, oder über die mRNA enzymatisch synthetisiert wird.

10

4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen im Anschluß an das Codon für die carboxyterminale Aminosäure zwei Stop-Codons enthält.

15

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I H-(X)<sub>m</sub>-A-B-C- nicht für H-Val-Val- steht, wenn n Null ist, D und E Thr, F Gly und G und H Glu bedeuten.

20

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen der DNA-Sequenz I entspricht.

0 171 024

1/1

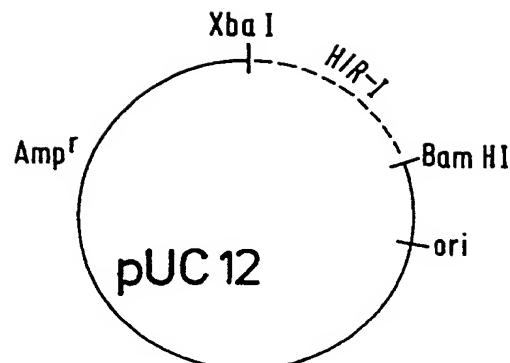


FIG.1

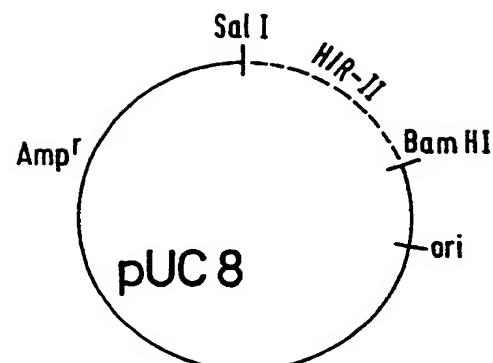


FIG.2

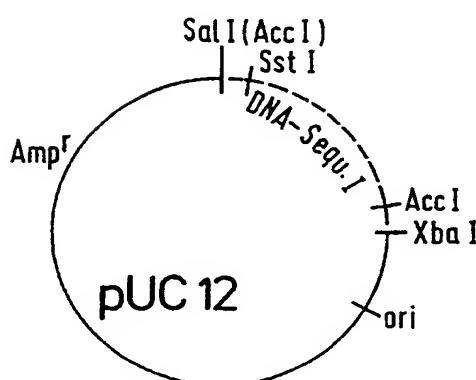


FIG.3

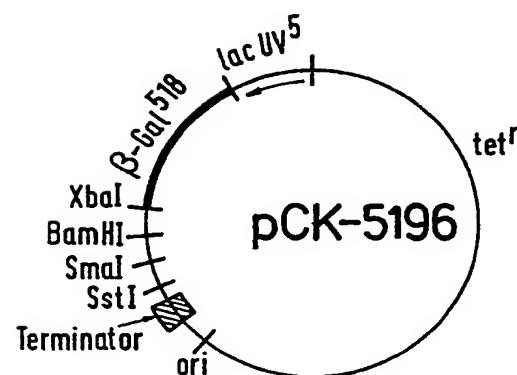


FIG.4

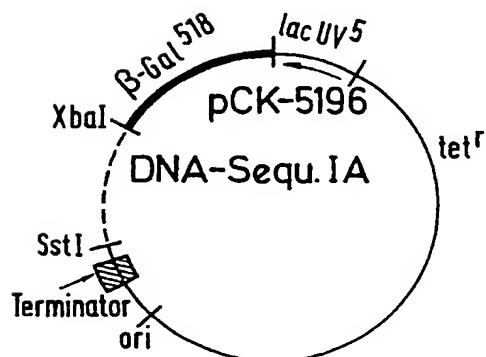


FIG.5

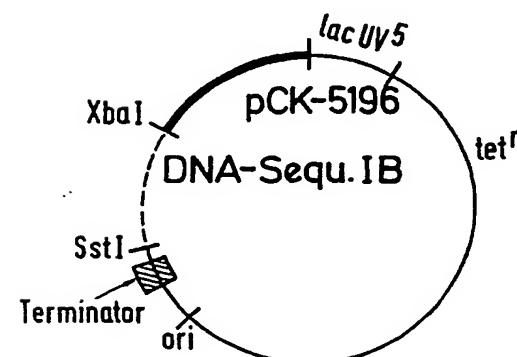


FIG.6



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0 171 024

EP 85109567.9

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	<p>FEBS LETTERS, Vol. 165, Nr. 2, 9. Jänner 1984, Amsterdam, New York</p> <p>J. DOOT et al. "The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor" Seiten 180-184</p> <p>* Gesamt *</p> <p>-----</p>	1,8	<p>C 12 N 15/00 C 12 P 21/02 C 12 P 19/34 C 07 K 7/10 C 12 N 1/20 //C 12 R 1:19</p>
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			<p>C 12 N C 12 P C 07 K</p>
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
WIEN		30-10-1985	WOLF
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
X	von besonderer Bedeutung allein betrachtet	E	älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist
Y	von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	D	in der Anmeldung angeführtes Dokument
A	technologischer Hintergrund	L	aus andern Gründen angeführtes Dokument
O	nichtschriftliche Offenbarung		
P	Zwischenliteratur		
T	der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	&	Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument